
**INVESTIGAÇÃO DA BANDA C₅ DA BUTIRILCOLINESTERASE HUMANA EM
PACIENTES COM GLAUCOMA**

Investigation of the C₅ band of the human butyrylcholinesterase in patients with
glaucoma

Melissa Cesar¹

Sheila Maria Swertz²

Fabiana A. Andrade³

Liya Regina Mikami⁴

Resumo:

O glaucoma é a primeira causa de cegueira irreversível no mundo. Sua principal característica é a degeneração das células ganglionares da retina, causada por um aumento da pressão intra-ocular levando a perda de campo visual. Pode ser uma doença adquirida ou congênita, podendo seguir vários padrões de herança genética. A enzima butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) é produzida pelo fígado, amplamente distribuída no organismo e cuja função fisiológica e substrato natural permanecem desconhecidos. Codificada pelo gene *BCHE*, localizado no braço longo do cromossomo 3 (3q26.1-q26.2) possui várias formas, dentre elas a banda C₅, que

1 – Biomédica formada pelas Faculdades Integradas do Brasil – Unibrasil.

2 - Médica especialista em Glaucoma do Instituto de Oftalmologia de Curitiba

3 – Doutoranda em Genética pela UFPR

4 – Doutora em Genética, professora das Faculdades Integradas do Brasil – Unibrasil

pode apresentar variação genética devido ao loco *CHE2*, que apresenta os alelos *CHE2 C₅⁺* e *CHE2 C₅⁻* responsáveis pela presença ou ausência desse complexo. Em 1967, Juul verificou uma alta frequência da banda C₅ em pacientes com glaucoma. O presente trabalho visou verificar e estimar a frequência da banda C₅ em pacientes com glaucoma a fim de se correlacionar a frequência do fenótipo *CHE2 C₅⁺* com o aparecimento da doença. Dentre os 16 pacientes analisados 31% apresentaram o fenótipo com *CHE2 C₅⁺*, frequência bem superior a encontrada na população normal (10,3%), o que sugere uma associação positiva entre a predisposição à doença e a presença do complexo C₅.

Descritores: Butirilcolinesterase, loco *CHE2*, banda C₅, glaucoma,

Abstract

The glaucoma is the first disease causing irreversible blindness in the world. Its main feature, the degeneration of retinal ganglion cells caused by an increased intraocular pressure leading to loss of visual field. It may be an acquired or congenital disease. May follow different patterns of inheritance. The butyrylcholinesterase enzyme (BChE, EC 3.1.1.8) is produced by the liver, is widely distributed in the organism and whose natural substrate and physiological function remain elusive. Encoded by the BCHE gene, located on the long arm of chromosome 3 (3q26.1-q26.2), it has several forms, one of the band C₅, may have genetic variation due to the variability of the *CHE2* locus located on chromosome 2q33-35, which presents alleles *CHE2 C₅⁺* and *CHE2 C₅⁻* responsible for the presence or absence of this complex. In 1967, Jull found a high frequency of C₅ band in patients with glaucoma. Therefore, this study aimed to investigate and estimate the presence of the C₅ band in patients with

glaucoma in order to correlate the frequency of C_5^+ phenotype *CHE2* with the onset of the disease. Among the analysis patient 31% presented the phenotype with *CHE2* C_5^+ well above the frequency found in the normal population (10.3%), suggesting a positive association between the predisposition to the disease and the presence of complex C_5 .

Descriptors: Butyrylcholinesterase, Loco *CHE2*, C_5 Band, Glaucoma.

Introdução

O glaucoma é uma doença insidiosa sendo responsável pela segunda maior causa de cegueira (sendo a primeira a catarata) e a primeira causa de cegueira irreversível no mundo ^{1,2,3,4,5,6,7,8}. Essa doença tem como principal característica a degeneração das células ganglionares da retina, causada geralmente por um aumento da PIO (pressão intra-ocular), ocasionando perda de campo visual ^{4,5,6,7,8,9,10}. Por ser assintomática, a busca ao auxílio médico tende a ser tardia e quando ocorre, na maioria das vezes, a perda do campo visual pode ser significativa. Uma vez que o serviço médico oftalmológico no país além de ser precário não é visto como rotina, acarretará dificuldade e demora na detecção da doença ⁹. Entretanto, a importância de um diagnóstico precoce é justamente para que não haja essa perda de visão que gerará dificuldades e diminuição da qualidade de vida de quem desenvolver o glaucoma ^{1,2,6,7,8,9}.

São considerados fatores de risco associados ao glaucoma, além do aumento da PIO (que deve estar sempre entre 13 mmHg e 18 mmHg), idade (por volta dos 40), histórico familiar (quem o possui tem de 3 a 9 vezes mais chances de desenvolver a doença) e etnia (afro-descendentes e asiáticos possuem de duas a quatro vezes mais predisposição). HAS (hipertensão arterial sistêmica), DM

(Diabetes Mellitus), Miopia e espessura corneana (espessuras normal é de aproximadamente 545 micras, espessuras mais grossas ou mais finas induzem a erros na medida da pressão) também são fatores associados, porém ainda controversos ^{1,2,4,9,10,11} . Por estar presente com maior incidência em pessoas de idade avançada, levando em consideração que a idade média da população tem aumentado, estima-se que poderá ocorrer um aumento de glaucomatosos nos próximos anos. Portanto, se não houver uma forma de diagnóstico precoce, a ocorrência de cegueira aumentará significativamente ¹.

Atualmente o diagnóstico é feito a partir da medida da PIO através do tonômetro de sopro ou de aplanção, o qual refere valores normalmente parecidos ou muito próximos em ambos os olhos. A partir de 21 mmHg considera-se caso de suspeita de glaucoma, sendo necessário demais exames para correlação clínica e confirmação de suspeita ^{2,11}, como por exemplo, exames para avaliar as vias de drenagem ocular (Gonioscopia), verificar diminuição de sensibilidade ou perda de campo visual (Campimetria Visual) e exames que avaliarão a degeneração do nervo óptico (Biomicroscopia de Fundo, Oftalmoscopia, Estéreo Foto de Papila e Tomografia de coerência Óptica – OCT), que servirão para correto diagnóstico e definição de tratamento ^{1,2}.

O tratamento é realizado com intuito de estacionar as lesões glaucomatosas ou impedir que novas apareçam. São utilizados medicamentos, geralmente de forma monoterápica, para manter a pressão-alvo (aproximadamente 18mmHg, conforme estágio da doença e idade do paciente). Dependendo do grau da lesão ou da ineficácia do tratamento, podem ser realizadas cirurgias como a trabeculoplastia,

que visa diminuir a resistência da saída do humor aquoso através da aplicação de laser na malha trabecular ^{1,2,11}.

A Organização Mundial do Genoma Humano propôs a sigla GLC (glaucoma) aos genes associados ao glaucoma. Os números 1, 2 e 3 que vêm após a sigla representam, respectivamente, glaucoma de ângulo aberto, glaucoma de ângulo fechado e glaucoma congênito. As letras A, B, C, indicam o primeiro e os subsequentes *locus* identificados para determinado tipo de glaucoma. Sendo assim, o primeiro *locus* identificado em associação com o GPAA (Glaucoma Primário de Ângulo Aberto) recebeu o nome de GLC1A, já o primeiro *locus* relacionado ao glaucoma congênito foi denominado GLC3A ¹².

O glaucoma pode ser uma doença adquirida ou congênita (1 a cada 10.000). Benedict (1842) foi quem sugeriu pela primeira vez a idéia de hereditariedade ligada ao glaucoma, através da observação de famílias com a doença. Desde então surgiram novos estudos sobre as relações de hereditariedade e suas complicações glaucomatosas que podem obedecer aos padrões mendelianos autossômicos recessivos (Glaucoma de Ângulo Aberto) ou autossômicos dominantes (Glaucoma Congenito) ^{9,13}, poligênicos e/ou multifatoriais ⁹. Esta é uma doença que mesmo quem possui o gene pode não tê-lo expresso e por conseqüência não desenvolver o glaucoma, ou seja, sua penetrância é reduzida ¹⁰.

O primeiro *locus* relacionado ao GPAA, o *GLC1A*, foi descoberto em 1993. Desde então 13 regiões do genoma foram associados e denominados *GLC1A*, *GLC1B*, até *GLC1M* ⁹, dentre esses 13 *loci*, 3 genes foram identificados, sendo eles *TIGR/MYOC* (Trabecular Meshwork-Induced Glucocorticoid Response Gene/ Myocilin Gene – *GLC1A*) descrito em 1997 por Stone et al localizado no

cromossomo 1q21-q31, *OPTN* (“Optineurin” Optic Neuropathy Induce Protein – GLC1E) identificado em 2002 por Rezaie et al. localizado no cromossomo 10p14-p15 e *WDR36* (“WD40-repeat 36”- GCL1G), localizado no cromossomo 5q22.1 identificado por Monemi et al. em 2005 ^{4,5,9}.

Juul em 1967 estudando um método para a separação e quantificação das isoenzimas das colinesterases no soro humano, observou uma frequência aumentada de uma banda chamada de C₅ da isoenzima da butirilcolinesterase humana, descrita por Harris em 1962, a qual esteve presente em 5 pacientes dos 7 estudados com glaucoma, sugerindo então uma maior prevalência dessa isoenzima em pacientes com diagnóstico de glaucoma.

A enzima butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8), também chamada de colinesterase do soro, pseudocolinesterase, colinesterase não específica e colinesterase do tipo S é uma enzima sérica, produzida pelo fígado, amplamente distribuída no organismo e cuja função fisiológica e substrato natural permanecem ainda desconhecidos ^{14,15,16,17}. Entretanto, a BChE já foi associada à condução nervosa lenta, metabolismo de lipídeos e xenobióticos e a hidrólise de ésteres de colina ¹⁵.

A BChE possui 574 aminoácidos, pode ser encontrada no sangue humano em várias formas moleculares: monômero, dímero, trímero e tetrâmero, ou ainda, compor formas heterólogas, nas quais está associada com outras substâncias como a albumina, a Alfa-2-macroglobulina e outras ainda não identificadas. Através de eletroforese de gel de poliacrilamida até 12 bandas com atividade de BChE podem ser vistas ^{15,18}.

É codificada pelo gene *BCHE*, localizado no braço longo do cromossomo 3 (3q26.1-q26.2)^{15,19,20,21}. É formada por 4 exons (2.416 pb) e 3 introns totalizando 64.558 pb, possui 2.445 pb dos quais 1.722 pb (pares de base) que são codificantes para a enzima madura, 723 pb não codificantes da enzima madura estão presentes no exon 1, parte inicial do exon 2 e parte final do exon 4. O exon 1 possui 149 pb, 1525 pb fazem parte do exon 2 das quais 83% são codificantes da enzima madura e contém a extremidade N-terminal da proteína além do primeiro códon que codifica o peptídeo maduro. O exon 3 contém 167 pb também codificantes para a enzima e o exon 4 com 604 pb codifica a extremidade C-terminal da proteína. Já os introns 1,2 e 3 possuem respectivamente 6272 pb, 56512pb e 12638 pb (Figura 1)¹⁹.

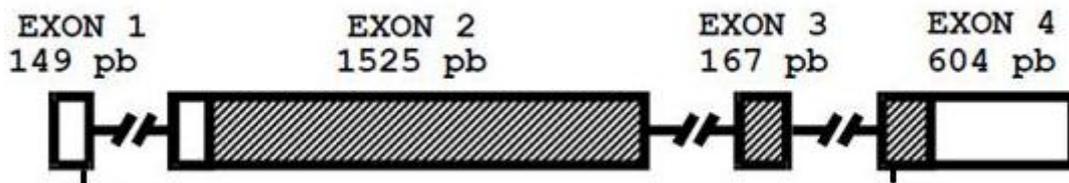


Figura 1.: Representação do gene *BCHE* com os quatro exons e seus respectivos pares de bases. A região hachurada corresponde à seqüência que codifica a proteína madura.

A BChE pode apresentar variação genética devido à variabilidade do loco *CHE2* localizado na região cromossômica 2q33-35, que codifica uma proteína, ainda desconhecida, responsável pela formação do complexo C_5 ¹³, cuja presença ou ausência é detectada em eletroforese. O loco *CHE2* apresenta os alelos *CHE2* C_5^+ e *CHE2* C_5^- responsáveis respectivamente, pela presença e pela ausência desse complexo, sendo que o alelo *CHE2* C_5^+ determina aumento de cerca de 25% na

atividade da BChE²². Atualmente, acredita-se que essa proteína desconhecida venha a ser peptídeos de uma proteína chamada lamelipodina^{23,24}.

A lamelipodina (Lpd) é uma proteína pertencente à família das proteínas MRL (proteínas responsáveis por serem adaptadoras de sinais para modular a actina do citoesqueleto),²⁵ e é constituída por polipeptídeos de prolina em sua região C-terminal. Acredita-se que o complexo C₅ seja formado por Lpd mutada a qual não é clivada por protease na região N e C terminal correta, formando assim uma estrutura maior que da lamelipodina encontrada no complexo C₄, ou seja, havendo essa formação de lamelipodina truncada, há o complexo C₅. O gene responsável pela formação da proteína desconhecida que forma o complexo C₅ está localizado na mesma região no cromossomo 2 (q33) que o gene da Lpd²⁶ (RAPH1 gene responsável por codificar a lamelipodina humana descrito por Nagase et al em 2000).

Tendo em vista os resultados descritos por Juul, o presente trabalho visou verificar e estimar a presença da banda C₅ em pacientes com glaucoma a fim de se correlacionar a frequência do fenótipo CHE2 C₅⁺ com o aparecimento da doença.

Materiais e Métodos

O presente trabalho foi aprovado pelo CEP (Comitê de Ética e Pesquisa) das Faculdades Integradas do Brasil - Unibrasil sob parecer de nº 045/2010.

Foram selecionados 16 dos 131 pacientes com glaucoma, independente do tipo, conforme análise de prontuário, disposição do paciente em colaborar com a

pesquisa, ceder amostra sanguínea e responder a questionário próprio, além de assinar o Termo de Consentimento Livre de Esclarecimento (TCLE).

Foram coletadas 10 mL de amostras sanguíneas de pacientes com glaucoma da cidade de Curitiba no Instituto de Oftalmologia de Curitiba. As amostras foram separadas em tubos com EDTA e tubo sem anticoagulantes, centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm. Foi separado soro em tubos do tipo eppendorf e congelados para análise de fenotipagem do loco *CHE2*.

Foi realizada eletroforese em gel de ágar para fenotipagem do loco *CHE2*, segundo técnica desenvolvida por ROBINSON et al (1957) e modificada por VAN ROS E VERVOORT (1973). Adaptações subseqüentes foram introduzidas por FADEL PICHETH (1991) e SOUZA (1995).

O gel de ágar foi preparado com uma solução de Bacto ágar (Difco) a 1,4% p/v em tampão citrato de sódio, pH 6,37 (solução estoque de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 6,7; pH ajustado com ácido cítrico 1,56 M). Essa solução foi aquecida por cerca de vinte minutos ou até que o ágar fosse totalmente dissolvido. Após o aquecimento, a solução foi vertida sobre uma placa de vidro de 230 x 160 mm. O gel foi resfriado completamente e então colocado na geladeira e mantido em repouso por pelo menos 12 horas a fim de diminuir o efeito da eletroendosse. Após esse período de repouso, as amostras de plasma foram aplicadas no gel através da extremidade de uma lâmina de metal (5 x 5 x 0,1 mm) onde foram colocados 2 microlitros de plasma ou soro sem EDTA. A placa contendo as amostras foi então submetida à eletroforese com tampão citrato pH 6,75 por quatro horas e meia (a 150 V; 35 mA e 5 W) Após a corrida eletroforética foi despejado sobre a placa o cromógeno-substrato, preparado imediatamente antes do uso. A solução

cromógeno-substrato foi preparada utilizando-se Fast Red TR Salt (SIGMA F-2768) a 0,1 p/v em tampão fosfato de sódio pH 7,1 (670 mL de Na₂HPO₄, 0,2 M e 330 mL de Na₂HPO₄, 0,2 M) e solução de Alfa-naftilacetato 30 mM, (2,5%v/v). A placa com o cromógeno-substrato foi lavada com água para retirar o excesso de corante. O gel então foi colocado em uma folha de papel filtro, prensado entre duas placas de vidro e levado a estufa à 37°C durante 2 dias para completa secagem.

Resultados e Discussões

Foi realizado levantamento de dados de 131 prontuários de pacientes com diagnóstico de glaucoma independente do tipo que compareceram ao Instituto de Oftalmologia de Curitiba – IOC (clínica de Curitiba que cedeu espaço para a pesquisa), de janeiro de 2010 a março de 2011. A idade média encontrada foi de 50 anos, porém na literatura encontra-se idade média para portadores de glaucoma por volta de 40 anos ^{1,3,4,9,10,11}. No presente estudo havia indivíduos glaucomatosos com idade entre 18 a 89 anos. Desse total observou-se que 48% dos pacientes pertencem ao gênero feminino e 52% ao gênero masculino, ou seja, não há prevalência conforme o sexo, observação a qual não foi encontrada nas literaturas consultadas.

Dos 16 pacientes que cederam amostras sanguíneas para fenotipagem da BChE, apenas um possui glaucoma de ângulo fechado, os demais possuem glaucoma de ângulo aberto o qual tem maior prevalência dentre a população de glaucomatosos no mundo ^{2,10}, não havendo amostras de pacientes com glaucoma congênito. Estes pacientes até o momento estão com quadro clínico controlado e sem perda visual significativa.

Do total de prontuários analisados, apenas 16 pacientes cederam amostras para fenotipagem da BChE. Deste total, 5 apresentaram a banda C₅, ou seja, 31% dos indivíduos foram compatíveis com o fenótipo CHE2C₅⁺ (Figura 2). Chautard-Freire- Maia et al. (1991) encontraram uma freqüência de 10,3% do fenótipo em estudos com a população normal de Curitiba (sem a doença), mostrando que entre os pacientes com glaucoma há uma maior freqüência do fenótipo CHE2 C₅⁺, indicando uma possível correlação entre a banda C₅ e o aparecimento da doença ($X^2 = 7,45$; $p = 0,0063$).

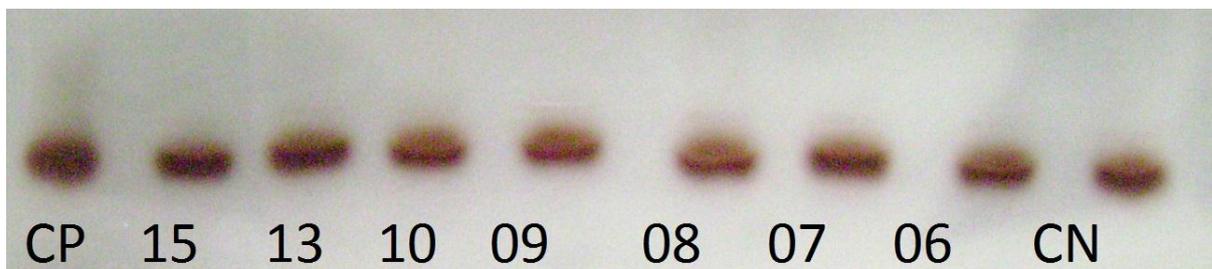


Figura 2: CP: Controle Positivo; 15,13,10,09,08,07,06: amostras aplicadas e CN: Controle Negativo.

Conforme análise feita com um número pequeno de amostras assim como Jull em 1967 que encontrou 5 dos 7 pacientes analisados, obtivemos resultado semelhante, uma maior freqüência do fenótipo *CHE2* em paciente com glaucoma, porém este é o primeiro estudo específico sobre o a correlação de aumento da banda C₅ em pacientes com glaucoma.

Para se ter uma certeza da influência da banda C₅, e possivelmente da lamelipodina sobre o glaucoma um maior número de glaucomatosos deve ser analisado.

Referencias Bibliográficas

1 - SBG, 2º Consenso Brasileiro de Glaucoma Primário de Ângulo Aberto/Sociedade Brasileira de Glaucoma, 2. 2005; São Paulo. PlanMack.

2 - SILVA F. C., Seus Olhos: orientações e cuidados com a saúde ocular - Curitiba. 2004 2 Edição. Cris Editora e Artes Gráficas Ltda.

3 - AGARWAL R., GUPTA S.K., AGARWAL P., SAXETA R., AGARWAL S.S., Current concepts in the pathophysiology of glaucoma, 2009, Review Article, Indian J Ophthalmol: 57:257-266

4 - UMBELINO C. C., Frequência das mutações T34T, E50K, M98K, 691_692insAG e R545K no gene "OPTINEURIN" em pacientes com glaucoma primário de ângulo aberto numa população brasileira, 2007 (Titulo de Mestrado) Faculdade de Ciências Medicas da Santa Casa de São Paulo.

5 - WIGGS J. L., Genetic Etiologies of Glaucoma, 2007, Arch Ophthalmol vol 125, Departament of Ophthalmology, Harvard Medical School, Boss, Mass.; p. 30-37.

6 - QUIGLEY HA: Number of people with glaucoma worldwide. Br J Ophthalmol, 1996; p. 389-93.

7 - URBANO AP, FREITAS TF, ARCIERI ES, URBANO AP E COSTA VP: Avaliação

125 Cadernos da Escola de Saúde, Curitiba, 8: 114-129

ISSN 1984-7041

dos tipos de glaucoma no serviço de oftalmologia da UNICAMP. Arq Bras Oftalmol, 2003; p. 61-5.

8 - FRASER S, BUNCE C, WORMALD R E BRUNNER E: Deprivation and late presentation of glaucoma: case-control study. Bmj, 2001; p. 639-643.

9 - ROCHA, A. V., Glaucoma e seus aspectos genéticos, 2010, (Titulo de Mestrado) Departamento de Ciências Biológicas Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz.

10 - CARRASCO, M.A.; CASIRAGHI, J.; HARTLEBEN, C.; MELLO, P.A.A.; Conviver com o glaucoma, 2010, Tradução, Marcilia Siqueira, 1ªed., Buenos Aires, Médica Panamericana.

11 - SIMONS J. Ma. Glaucomas Hipertensiones Oculares, 1973, Balmes, JMS. Loci. Am J Hum Genet, 1997.

12 - RAYMOND V. Molecular Genetics of the Glaucomas: Mapping of the five "GLC" Loci. Am J Hum Genet, 1997; p. 272-277.

13 - HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A. E ROBSON, E.B. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. **Nature**, London, v. 196, p. 1296-1298, 1962.

14 - WESCOE, W.C.; HUNT, C.H.; RIKER, W.F.; LITT, I.C. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, v. 149, p. 549-551, 1947.

15 - ALCÂNTARA, V.M. Fenótipos da Butirilcolinesterase e suas relações com dados antropométricos, bioquímico-hormonal e pressão arterial em obesos e na população geral de Curitiba, PR. Curitiba, 2000. 230f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

16 - FURTADO, L. Variabilidade genética da butirilcolinesterase e obesidade. 174 f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

17 - SOUZA, R. L. R., FURTADO, L., DINIZ A.C.P., SILVA, A.C.D., KAISS, J., PETZL-ERLER, M.L., and CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A., Studies on a Heterologous Complex Formed By Human Butyrylcholinesterase, *Biochemical Genetics*, Vol 41. 2003. p. 141-150.

18 - JUUL PER, Human Plasma Cholinesterase Isoenzymes, 1967, *Clínica Chimica Acta*; p. 205-213.

19 - ARPAGAUS, M.; KOTT, M.; VATSIS, K.P.; BARTELS, C.F.; LA DU, B.N.; LOCKRIDGE, O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidences for a single copy. *Biochem.*, London, v. 29, p. 124-131, 1990.

20 - GAUGHAN, G.; PARK, H.; PRIDDLE, J.; CRAIG, S. Refinement of the localization of human butyrylcholinesterase to chromosome 3q26.1-q26.2 using a PCR-derived probe. **Genomics**, Amsterdam, v.11, p. 455-458, 1991.

21 - ALLDERCIDE, P.W.; GARDNER, H.A.R.; GALUTIRA, D.; LOCKRIDGE, O.; LADU, B.N.; McALPINE, P.J. The clones butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site, 3q26. **Genomics**, Amsterdam, v.11, p. 452-454, 1991.

22 - HARRIS, H. The principles of human biochemical genetics;. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biochemical, 1980.

23 - LI, H.; SCHOPFER, L. M.; MASSON, P.; LOCKRIDGE, O. Lamellipodin praline rich peptides associated with native plasma butyrylcholinesterase tetramers. *Biochemical Journal*, London, v. 411, p. 425-432, 2008.

24 - KRAUSE, M.; LESLIE, J.D.; STEWART, M. et al. Lamellipodin, an ena/vasp ligand, is implicated in the regulation of lamellipodial dynamics. *Dev Cell*. 7, p. 571-583, 2004.

25 - LAFUENTE, E.M; VAN PUIJENBROEK, A.A.F.L; KRAUSE, M.; CARMAN, C.V. RIAM, an Ena/VASP and Profilin Ligand, Interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1- Induced Adhesion. *Dev Cell*, v. 7, p. 585-595, 2004.

26 - LOCKRIDGE, O. ; ARPAGAU, M., KOTT, M., VATSIS, K. P., BARTELS, C. F.,
LA DU, B. N., Biochemistry 29, 124-131, 1990

27 - NAGASE, T.; KIKUNO, R.; HATTORI, A.; KONDO, A.; OKUMURA, K.; OHARA,
O. Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. XIX. The
complete Sequences of 100 New cDNA Clones from Brain Which Code for Large
Proteins in vitro. Dna Research 7,p. 347-355, 2000.

28 - ROBINSON, A. R.; ROBSON, M.; HARRISON, A. P. ; ZUELZER, W.W. ; A new
technique for differentiation of hemoglobin. J. Lab. Clin. Méd, 1957.

29 - VANS ROS, G.; VERVOORT, T, Frequencies of the “ atypical” and C₅ variants of
serum cholinesterase in Zairians and Belgians. Detection of the C₅ variants by agar
gel electrophoresis with an acid buffer. Ann. Soc. Belg. Med. Trop. 1973.

30 - FADEL PICHETH, C. Variabilidade do loco BChE da Butirilcolinesterase e peso
do adulto em amostra de Curitiba. Curitiba, 1991. (Tese de Mestrado), Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

31 - SOUZA, R.L.R.; Estudos sobre nova banda da buritilcolinesterase humana
(C4/5) verificada em eletroforese. Curitiba, 1995. 74f. Dissertação (Mestrado em
Genética) – Setor Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

32 - CHAUTARD-FREITE-MAIA, E.A.; PRIMO-PRAMO, S.L.; PICHETCH, G.;
LOURENÇO, M.A.C.; VIEIRA, M.M.; The C5 isozyme of serum cholinesterase and
adult weight. Hum. Hered., New York, v. 41, p. 330-339, 1991.